illumina®

TruSeq® カスタムアンプリコンライブラリー調製ガイド

FOR RESEARCH USE ONLY

ILLUMINA PROPRIETARY
カタログ番号 FC-130-9005DOC
部品番号 15027983 改訂 C JPN
2013 年 8 月

この文書およびコンテンツの所有権は Illumina, Inc. およびその関連会社("Illumina") に帰属し、ここで記述される製品の使用に関連する顧客によって契約のもと使用されることを意図し、その他の目的はありません。この文書およびコンテンツはその他のいかなる目的で使用または配布してはならず、および/または Illumina の書面による事前同意なしにはいかなる方法においても、その他の方法での伝達、開示、または複製をしてはなりません。Illumina はこの文書によって、特許、商標、著作権、判例法における第三者の権利または同様の権利のもと、いかなるライセンスも譲渡することはありません。

この文書に含まれる説明は、ここで記述される製品の使用を適切かつ安全なものにする目的で、適格で、適切なトレーニングを受けた担当者が正確および明確に使用する必要があります。この文書の内容はすべて、そのような製品を使用する前に全体を読み、理解する必要があります。

ここに含まれるすべての説明を完全に読み、それに明確に従わない場合は、製品の損傷、ユーザーまたその他を含めた人体への傷害、その他所有物への損害につながることがあります。

Illumina はここに記述される製品(その部品またはソフトウエア) の不適切な使用、また、顧客がそのような製品を購入した場合に関して、Illumina によって付与された明示的な書面によるライセンスまたは許可範囲外でそのような製品を使用することによって発生するいかなる状況においても責任を負いません。

研究目的のみに使用

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina、IlluminaDx、BaseSpace、BeadArray、BeadXpress、cBot、CSPro、DASL、DesignStudio、Eco、GAIIx、Genetic Energy、Genome Analyzer、GenomeStudio、GoldenGate、HiScan、HiSeq、Infinium、iSelect、MiSeq、Nextera、NuPCR、SeqMonitor、Solexa、TruSeq、TruSight、VeraCode、パンプキンオレンジ色、および Genetic Energy ストリーミングベースデザインは Illumina, Inc. の登録商標または商標です。ここに含まれるその他すべてのブランドおよび名称の所有権はそれぞれの所有者に帰属します。

本キットに含まれているコンポーネントを用いて実行する方法は、出願特許の権利範囲となります。

For Research Use Only – ヒトや動物への医療用または臨床診断用には使用しないでください。本製品には、Illumina, Inc. が販売するために Promega Corporation によって製造された GoTaq® Hot Start Polymerase (米国特許番号 5,338,671 と 5,587,287 およびこれらに対応する外国の特許番号によって Promega Corporation に対してライセンスが供与されている) が含まれています。

Promega

本製品を使用する前にお読みください。

本製品とその使用法および処分法は以下に定める条件に従います。購入者がこの条件に従わない場合、Illumina は本製品の使用を認めず、購入者は本製品を使えません。

1 **定義**.″**Application Specific IP** とは Illumina が保有または管理する本製品 (またはその使用法) に関連した知的財産権を意味し、特定の分野または用途にのみ適用されます。Application Specific IP は、Illumina が保有または管理する、すべての用途およびすべての使用分野における本製品 (または使用法) に共通の性質または機能をカバーする知的財産権 (Core **IP**) を除外します。Application Specific IP と Core IP は分かれていて重複が無く、Illuminaが保有または管理する全知的財産権の一部です。Illumina が知的財産権を保有する特異的診断法と、特異的犯罪捜査法と、特異的核酸バイオマーカー、シーケンサー、またはバイオマーカー、シーケンサーの組み合わせとは、非常に多い Application Specific IP の一例です。″**消耗品**とは Illumina がハードウェアで使用し消費することを想定している、Illumina ブランドの試薬または消費する商品を意味します。″**マニュアル**とは Illumina が発行した本製品の取扱説明書を意味し、添付文書、本製品に付随する文書、本製品または本製品のパッケージで言及された他の全文書などを含み、Illuminaが出荷した日から有効になります。マニュアルには本文書も含まれます。″**ハードウェア**とは Illumina ブランドの機器、付属品、周辺機器を意味します。″**Illumina**とは場合に応じて Illumina, Inc. または Illumina 関連会社を意味します。″**製品**とは本文書に関連する製品 (ハードウェア、消耗品、ソフトウェア) を意味します。″**購入者**とは正当かつ合法的に本製品を Illumina または Illumina が認可した販売者から入手した個人または団体を意味します。″**ソフトウェア**とは Illumina ブランドのソフトウェア (ハードウェアのオペレーティングソフトウェア、データ分析ソフトウェアなど) を意味します。全ソフトウェアはライセンスを受けており、売却はできず、ソフトウェアのエンドユーザーライセンス契約の追加条項に従います。″**仕様書**とは Illumina が発行した本製品の仕様書を意味し、Illumina から製品が出荷された日から有効になります。

2 **研究目的にしか使用できません**これらの条件に従えば、Illumina 社員による文書で別段の合意の無い限り、購入者は非独占的な、譲渡不可の、個人的な、サブライセンス不可の権利のみを、Illumina Core IP の下で、製品が Illumina から出荷された日から、本製品を購入者の施設で購入者固有の研究目的 (第三者による研究サービスも含む) に、本製品マニュアルに従って使用する場合に限り認められます。**ただし、特に以下の使用法は除外されます。** (a) Illumina に Application Specific IP の権利またはライセンスを要求する使用。(b) 以前使用した消耗品の再使用。(c) 本製品の分解、リバースエンジニアリング、逆コンパイル、逆アセンブル。(d) 本製品から部品を分離、抽出、隔離、および本製品の許可されていない分析。(e) 本製品の運用方法のアクセス、決定。(f) Illumina のハードウェアに非 Illumina の試薬/消耗品を使用 (仕様書またはマニュアルで別段の定めがある場合を除く)。(g) ソフトウェアまたは第三者のソフトウェアの譲渡またはサブライセンス。全ソフトウェアは、個別に提供される場合、インストールされた状態で提供される場合、製品に組み込まれて提供される場合のいずれも、購入者にライセンスが供与され、売却はできません。本セクションで明示されない限り、Illumina の知的財産権の権利またはライセンスはどれも、明示的に、暗黙に、禁反言により供与されません。

購入者は本製品の目的用途に必要な知的財産権をすべて保有しているかどうかの決定に完全に責任を負います。これには第三者の権利と Application Specific IP が含まれますがその限りではありません。Illumina は購入者の使用用途が第三者の知的財産権または Application Specific IP を侵害しないことを保証しません。

3 **規制**本製品はアメリカ食品医薬品局、または他のどの取締機関からも、国内外を問わず、研究目的であるか、診断目的であるか、他の目的であるかを問わず、どの使用用途についても、認可、審査、ライセンスを受けていません。本製品は研究目的にのみ認められます。購入者は本製品の目的用途に必要な規制認可を受けていることを確認する必要があります。

4 **不正使用**.購入者は以下のことに同意するものとします。(a) 各消耗品は一度だけ使用する。(b) Illumina の消耗品と試薬のみを Illumina のハードウェアで使用する。(a)–(b) の制限は本製品のマニュアルまたは仕様書で別段の定めがあれば適用されません。購入者は以下の行為を行わず、第三者にも認めないものとします。(i) 製品を分解、リバースエンジニアリング、逆コンパイル、逆アセンブリする。(ii) 本製品の部品を分離、抽出、隔離する、または本製品と部品に対して本製品のマニュアルで明示されていない分析を行う。(iii) 本製品の運用方法にアクセスし決定する。(iv) ソフトウェアまたはすべての第三者のソフトウェアを譲渡またはサブライセンスを承認する。購入者はさらに、本製品の運用方法とその内容は Illumina が権利を保有し、本製品は Illumina の企業秘密を包含または具体化していることに同意するものとします。ここで示す条件と制約は販売条件を想定しており、本製品の販売と購入者による使用を管理します。

5 **有限責任法律の認める範囲において、いかなる場合も Illumina またはその販売者は購入者またはすべての第三者に対し、代用製品とサービスの費用、利益損失、データまたは事業について、また、本製品の販売、使用、下記の Illumina 製品の性能、すべての条件から生じる、またはそれらと制限なく関連する、すべての間接的な、特別な、偶発的な、例外的な、結果的な、懲罰的な損害賠償について、原因の如何を問わず、かつ責任の根拠が契約、違法行為 (過失を含む)、厳格責任であるかを問わず、責任を負いません。**

6 **Illumina が購入者または第三者に負う、本製品 (その使用も含む) および下に示す Illumina 製品の性能などの条件が原因で発生した、またはそれらに関連して発生した累積的な損害賠償金の総額は、責任の根拠が契約、違法行為 (過失を含む)、厳格責任であるかを問わず、いかなる場合も、この製品のためにIllumina に支払われた総額を超えることはありません。**

7 **Illumina が提供する保証の制限Illumina は法律の認める範囲において、ここに記す明示的な製品保証に従って、本製品、すべての黙示的な商品適格性の保証、特定用途への適合性、権利を侵害しないこと、または履行、交渉、使用、売買の過程など商品に関して、明示的、黙示的、または制定法上のいずれであるかにかかわらず保証せず、すべての保証を明示的に否定します。上記の一般化に限定されず、Illumina は本製品の購入者の使用用途すべてについて、いかなる要求、抗議、保証にも応じません。**

8 **製品保証**.すべての保証は購入者のみに適用され、購入者の関連会社も含め、第三者には譲渡または移転できません。すべての保証は特定施設のものであり、Illumina が移転を実施する場合を除き、製品が購入者の別の施設に移動する場合、保証は移転しません。

a **消耗品の保証**.Illumina はカスタム消耗品以外の消耗品が、(i) Illumina から出荷されて 3 か月以内、(ii) Illumina が消耗品に記載した消費期限、使用可能期限のいずれか遅い方までは仕様に従うことを保証しますが、出荷から 12 か月移行はいかなる場合も保証されません。カスタム消耗品 (仕様または設計に合わせて購入者が作成した消耗品、または Illumina に対し購入者から代わりに提供された消耗品) については、Illumina はカスタム消耗品が Illumina の標準製造方法と品質管理プロセスに従って作成され試験されることだけ保証します。Illumina はカスタム消耗品が購入者の意図したように機能し、意図したように使用できることを保証しません。

b **ハードウェアの保証**.Illumina はハードウェアが、アップグレードコンポーネントを除き、Illumina から出荷されて 12 か月は仕様に適合することを保証します。ただし、ハードウェアを Illumina が設置する場合は、保証期間は設置日または出荷後 30 日以内のどちらか早い方から始まります (「基本ハードウェア保証」)。「アップグレードコンポーネント」とは購入者が以前入手したハードウェアに対して Illumina が提供した部品、修正、改造を意味します。Illumina はアップグレードコンポーネントが設置された日から90日間は仕様に適合することを保証します。アップグレードコンポーネントのハードウェアに関する保証は、アップグレードが Illumina によって Illumina の設備で実行された場合 (この場合、ハードウェアは基本ハードウェア保証が付いた状態で購入者に出荷されます) を除いて延長されません。

c **保証範囲からの除外**.上記の保証は、(i) 乱用、誤用、過失、怠慢、事故、不適切な保管、マニュアルや仕様書と異なる使用、(ii) 不適切な取扱い、設置、維持、修理 (Illumina の従業員によるものを除く)、(iii) 許可の無い修正、(iv) 不可抗力による出来事、(v) Illumina が提供したものではない第三者の商品 (製品のマニュアルまたは仕様書に第三者の商品を本製品に使用することが明示的に記述されている場合を除く) が原因で発生した不具合には適用されません。

d **保証の手順**.この保証の下で修理または交換の資格を得るには、購入者は (i) 即座に Illumina のサポート部門に連絡を取り不具合を報告し、(ii) Illumina in と協力して不具合を確認、診断し、(iii) 以下の指示に従って事前に Illumina に対し送料を支払って製品を返送するか、Illumina と購入者が同意した場合は、Illumina が承認した修理係が不具合を確認して修理します。

e **保証における唯一の救済**.Illumina は自身の判断で、保証の対象であることを確認した不具合のある商品を修理または交換します。修理または交換した消耗品には 30 日間の保証か付きます。ハードウェアは機能的に同等な、中古、または新品のハードウェアまたは部品で修理または交換されます (ハードウェアの部品に不具合がある場合のみ)。ハードウェアが全体的に交換された場合は、交換したものの保証期間は発送した日から 90 日間、または最初のハードウェアの保証期間のどちらか短い方になります。部品が1つでも修理または交換された場合は、その部品の保証期間は発送日から 90 日または最初のハードウェアの保証期間のどちらか短い方になります。ここに記載されている保証の下における購入者の唯一の救済と Illumina の唯一の義務は前述されています。

f **第三者の商品と保証**.Illumina は第三者が本契約書上の購入者に提供したすべての商品について保証義務を負いません。第三者の商品とは第三者の名前が付いた商品を意味します。第三者の商品に対する保証は、いかなる場合も、その製造業者が負います。文書による要求があれば、Illumina は購入者.に対するどのような保証も通過させるように努めます。

9 **補償**.

a **Illumina による侵害の補償**.Illumina の補償義務の除外 (下記セクション 9(b))、補償義務の条件 (下記セクション 9(d)) を含むがその限りでない条件に応じて、Illumina は (i) 第三者が本製品は研究目的で条件に従って、製品のマニュアルと仕様書に従って使用する場合に、第三者が保有している正当で法的拘束力のある知的財産権を侵害すると主張して行動を起こした場合に、購入者を保護、補償、免責し、(ii) そのような侵害訴訟に関連して購入者が支払った全和解金と全最終判決と費用 (合理的な弁護士費用も含む) を負担します。本製品とその一部が侵害訴訟の対象になるか、Illumina が対象になり得ると判断した場合は、Illumina は自身の判断で (A) 購入者が本製品を使い続ける権利を獲得するか、(B) 本製品を修正またはよく似た権利を侵害しない製品で交換するか、あるいは (C) 本製品の返却と、本製品に関する権利、ライセンス、その他購入者に与えたすべての許可を中断を請求し、使い切った消耗品や期限切れの消耗品は返金の対象にならないという条件で購入者に対して返品時点での減価償却した金額 (購入者の公式の記録に表示) を返金する権利を有します。本セクションは第三者の知的財産権侵害に対する Illumina の全責任を記述します。

b **Illumina の補償義務の除外**.Illumina は侵害請求が以下に挙げる使用方法に対してのものである場合は、購入者を保護、保証、免責する義務を負いません。(i) 研究以外の方法または目的で本製品を使用。(ii) 本製品を仕様書、マニュアル、本契約書で購入者に明示的に認められた権利に合わないすべての使用方法、または購入者による条件違反。(iii) Illumina が提供したものではない製品、材料、サービスと組み合わせて使用。(iv) 本製品を Illumina が提供したものではないアッセイやその他のプロセスを実施するのに使用。(v) 購入者が代理で供給した本製品の仕様書とマニュアルに Illumina が準拠。((i) – (v) は「除外される請求」と呼びます。)

c **購入者による補償**.購入者は以下に挙げることが原因で、またはそれに関連して発生した、身体傷害、死亡訴訟、第三者の知的財産権の侵害など、いかなる訴訟、責任、損害、罰金、刑罰、訴訟原因、ありとあらゆる損失に関して、本製品の開発に貢献した、Illumina とその関連会社、関連会社以外の協力者、開発パートナーと各役員に対して、保護、補償、免責します。(i) 購入者が条件に違反。(ii) 購入者が研究以外の分野で本製品を使用。(iii) 本製品の仕様書とマニュアルに合わないすべての使用。(iv)「除外される請求」すべて。

d **補償義務の条件**.当事者が補償義務を負うには、補償を求める当事者が (i) 即座に他方の当事者に対して書面で請求または訴訟を通知し、(ii) 他方の当事者対しにその請求と訴訟について防御と合意の独占的な管理と権限を与え、(iii) 他方の当事者が事前に書面で同意していない知的財産権の侵害を認めておらず、(iv) 他の当事者が書面で事前に同意していない請求または訴訟について合意または妥協を締結しておらず、(v) その請求または訴訟について防御する他方の当事者に対し合理的な援助を提供する (ただし、その当事者が補償を受ける当事者に対して、援助の際に立て替えられた合理的な費用を返金する必要がある) ことが条件になります。

e **第三者の商品と補償**.Illumina は第三者から購入者に提供されたいかなる商品についても補償義務を負いません。第三者の商品とは第三者の名前が付いたものを意味します。第三者の商品に関する購入者の補償請求権は、もしある場合は、その製造業者または使用許諾者の補償に準拠するものとします。文書による要求があれば、Illumina は購入者に対するその補償があれば通過させるように努めます。

Revision History (改訂履歴)

パーツ番号	改訂	日付	変更の内容
15027983	C	2013 年 8 月	このガイド改訂版において以下の点を変更: ・「お使いになる前に」の内容を再構成し、いくつかの内容を付録「*サポート情報*」に移動 ・ 試薬 OHS2、ELM4、LNS2 の紹介 ・ 高品質ゲノムDNAについて推奨されるインプットおよび体積を変更3ページの「DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)」を参照してください。 ・ OHS2 を使用するハイブリダイゼーションの説明を変更 ・ 100 ng 未満の DNA インプットの PCR サイクル条件の変更18ページの「PCR Amplification (PCR 増幅)」。 ・ 34ページの「Library Pooling and MiSeq Sample Loading (ライブラリーのプーリングおよび MiSeq でのサンプルのロード)」で MiSeq 試薬キット v3 をサポートする DAL とサンプルプールの調製についての推奨事項を変更

パーツ番号	改訂	日付	変更の内容
15027983	B	2012 年 9 月	このガイド改訂版において以下の点を変更: ・ 高品質のゲノム DNA と、FFPE DNA を使用する場合の推奨事項に関して、「DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)」を変更。3ページの「DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)」を参照してください。 ・ 非結合オリゴの除去を目的としたフィルタープレートの予洗と洗浄に関する推奨事項を更新。12ページの「Removal of Unbound Oligos (非結合オリゴの除去)」を参照してください。 ・ ライブラリーのノーマライズ後に Library Normalization Wash 1 (LNW1) の上清を取り除く手順を変更。29ページの「Library Normalization (ライブラリーのノーマライズ)」を参照してください。 ・ Illumina Experiment Manager の使用時に必要なワークフローを指定する手順を変更。54ページの「MiSeq Sample Sheet Preparation (MiSeq サンプルシートの準備)」を参照してください。 ・ 56ページの「Illumina Amplicon Viewer」の新しいセクションを含め、設計からデータ解析まで TSCA プロセスを概説。43ページの「TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Process Overview (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製プロセスの概要)」を参照してください。 ・ 新しいアンプリコンサイズ、FFPE DNA およびさまざまなターゲットマルチプレックスレベルをサポートするためにアッセイ条件を拡張。18ページの「PCR Amplification (PCR 増幅)」および24ページの「PCR Clean-Up (PCR の精製)」を参照してください。
15027983	A	2011 年 10 月	初回リリース

Table of Contents (目次)

Revision History (改訂履歴) vi
Table of Contents (目次) viii

章 1 Overview (概要) 1

Introduction (はじめに) 2
DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項) 3
Additional Resources (追加のリソース) 4

章 2 Protocol (プロトコール) 5

Introduction (はじめに) 6
TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 Workflow (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のワークフロー) 7
Hybridization of Oligo Pool (オリゴプールのハイブリダイズ) 8
Removal of Unbound Oligos (非結合オリゴの除去) 12
Extension–Ligation of Bound Oligos (結合オリゴの伸長–ライゲーション反応) 16
PCR Amplification (PCR 増幅) 18
PCR Clean-Up (PCR の精製) 24
Library Normalization (ライブラリーのノーマライズ) 29
Library Pooling and MiSeq Sample Loading (ライブラリーのプーリングおよび MiSeq でのサンプルのロード) 34

付録 A Supporting Information (サポート情報) 39

Introduction (はじめに) 40
How Does the TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Assay Work? (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製アッセイの機能について) 41
TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Process Overview (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製プロセスの概要) 43
Acronyms (頭字語) 46
TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Kit Contents (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製キットの内容) 48
User-Supplied Consumables (ユーザーが用意する消耗品) 51
Equipment (器具) 52
MiSeq Sample Sheet Preparation (MiSeq サンプルシートの準備) 54
Illumina Amplicon Viewer 56

テクニカルサポート 57

Overview (概要)

Introduction (はじめに) 2
DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項) 3
Additional Resources (追加のリソース) 4

Introduction (はじめに)

TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 (TSCA) を使用すると、1 回のマルチプレックス反応にて最大 1,536 アンプリコンまで、600 kb 以上に及ぶゲノムのターゲット領域をシーケンスできます。この高度なターゲット方法により、広範囲にわたるアプリケーションでゲノム変異の検出、確認、スクリーニングを迅速かつ効率的に実行することが可能になります。TSCA では、1 回の反応で最大 1,536 アンプリコンを生成することにより、最大レベルのマルチプレックスを実現できます。また、統合されたインデックスにより、MiSeq 1 ランあたりで最大 96 サンプルのシーケンスがサポートされます。TSCA は、MiSeq システムのロングペアエンドリード機能、スピード、高品質のデータを活用します。

Excellent Multiplexing Capability (優れたマルチプレックス機能)

- 1 回の反応で最大 1,536 アンプリコンを増幅し、1 回の MiSeq ランで最大 96 サンプルをシーケンスできます。

Revolutionary Assay with Fast and Simple Workflow (迅速で容易なワークフローによる革新的なアッセイ)

- ハンズオン時間を 3 時間以内に抑えながら、1 枚のプレートで 96 サンプルにわたり最大 1,536 アンプリコンを生成できます。

Customized Design (カスタム設計)

- Illumina のオンラインソフトウェアである DesignStudio を使用すると、どんなアンプリコンサイズやリファレンスゲノムに対してでもプロジェクトを簡単に作成して管理することができます。

Automated Data Analysis (自動データ解析)

- 装置上のシンプルな自動解析ソフトウェアを使用して、すべてのサンプルで変異コーリングと解析を実行できます。

Complete Amplicon Sequencing Solution for MiSeq (MiSeq 用の完全アンプリコンシーケンスソリューション)

- オンラインでのプローブの設計とオーダー、アッセイ、シーケンス、自動データ解析、結果確認用のオフラインソフトウェアを含め、DNA からデータまで完全に統合された便利なソリューションを利用することができます。

DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)

DNA のタイプ	サポートしているアンプリコンサイズ	インプット (最大 15 µl)	A260/A280	FFPE DNA QC
高品質のゲノム DNA	150 bp、175 bp、250 bp、425 bp	50 ng (最小) 250 ng (推奨)	1.8–2.0	必要ない
FFPE ゲノム DNA	150 bp と 175 bp のみ	250 ng (最小)	1.8–2.0	Illumina FFPE QC キット (WG-321-1001) Δ Cq ≤ 2.0

Input DNA Quantitation (インプット DNA の定量化)

Illumina は、開始ゲノム物質を定量化することを強く推奨します。UV スペクトラムベースの方法ではなく、蛍光ベースの方法 (PicoGreen など) を使用して開始ゲノム物質を定量化してください。二本鎖 DNA (dsDNA) 特異的な色素を使用する蛍光ベースの方法では、多くの一般的な汚染要因物が存在していても、dsDNA を特異的かつ正確に定量化します。一方、260 の光学密度 (OD) 測定値に基づく UV スペクトラムベースの方法では、gDNA 調製で一般的に検出される RNA や他の汚染要因物が存在していると、DNA 濃縮が過大評価されてしまう傾向があります。

Assessing DNA Quality (DNA 品質の評価)

FFPE DNA が TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製用に十分な品質かどうかを判断するため、Illumina FFPE QC キットを使用することが強く推奨されます。また、260 nm と 280 nm での吸光度の比も、サンプルの純度を示すものとして使用されます。このプロトコールは、吸光度比が 1.8 ～ 2.0 の DNA に対して最適化されています。

Additional Resources (追加のリソース)

以下のリソースは TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 プロトコールガイダンスとサンプルトラッキングに利用します。このリソース、および他のリソースはウェブ サイト Illumina にあります。アドレスは support.illumina.com/sequencing/kits.ilmn です。アクセス後、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 [Support] を選択してください。

リソース	説明
Training	TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 プロセスの要素を描写します。経験の浅いユーザーは、サンプル調製を開始する前にこれらのビデオを見るようにしてください。 **TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポート**ページの[Training]をクリックしてください。
ベストプラクティス	このプロトコール特有のベストプラクティスを提供します。サンプル調整を始める前に見直してください。トピックスには が含まれます。 · サンプルの扱いについての一般的なアドバイス · 磁気ビーズの取扱い · 試薬の扱い · クロスコンタミネーションの防止 **TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポート**ページの[Best Practices]を選択してください。
Experienced User Card と Lab Tracking Form (part # 15027985)	プロトコールの説明書が付属していますが、このユーザーガイドほど詳しくはありません。**経験の少ないユーザーは、EUC** を使用するのではなく、このユーザーガイドに従うことが強く推奨します。 **TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポート**ページの[Documentation &Literature]をクリックしてください。
Illumina Experiment Manager (IEM)	Illumina シーケンサーと分析ソフトウェア用のサンプルシートを作成および編集し、サンプルプレート のパラメーターを記録します。 ソフトウェアをダウンロードするには、**TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポート**ページの[Downloads]をクリックしてください。 文書をダウンロードするには、**TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポート**ページの[Documentation&Literature]をクリックしてください。

Protocol (プロトコール)

Introduction (はじめに) 6
TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 Workflow (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のワークフロー) 7
Hybridization of Oligo Pool (オリゴプールのハイブリダイズ) 8
Removal of Unbound Oligos (非結合オリゴの除去) 12
Extension–Ligation of Bound Oligos (結合オリゴの伸長–ライゲーション反応) 16
PCR Amplification (PCR 増幅) 18
PCR Clean-Up (PCR の精製) 24
Library Normalization (ライブラリーのノーマライズ) 29
Library Pooling and MiSeq Sample Loading (ライブラリーのプーリングおよび MiSeq でのサンプルのロード) 34

Introduction (はじめに)

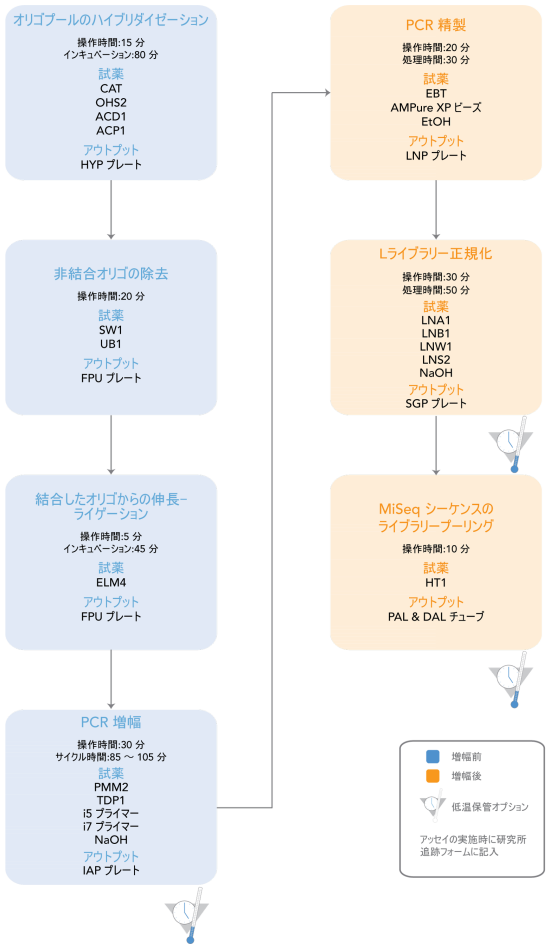
この章では、TruSeq カスタムアンプリコン プロトコールについて説明します。

- 次に進む前にベストプラクティスをご覧ください。4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」には、Illumina ウェブサイト上で TruSeq カスタムアンプリコン ベストプラクティスにアクセスする方法についての情報が載っています。
- 指定の容量とインキュベートパラメーターを使用して、表示されている順序でプロトコールを実施してください。
- アダプターインデックスチューブを使用してプーリングする場合は、後のデータ解析で参照できるよう、ライブラリー調製を開始する前にサンプルに関する情報を記録してください。
  - IEM を使用して Illumina シーケンサーと分析ソフトウェア用のサンプルシートを作成および編集します。4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」には、Illumina ウェブサイトで IEM ソフトウェアと文書をダウンロードする方法についての情報が載っています。

TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 Workflow (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のワークフロー)

下の図は、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 キットを使用したワークフローを説明した略図です。安全な停止ポイント (SAFE STOPPING POINT) は、ステップごとに示されています。

図 1　TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のワークフロー



Hybridization of Oligo Pool (オリゴプールのハイブリダイズ)

このステップでは、対象領域に特異的な上流および下流のオリゴを含むカスタムプールを、ゲノム DNA サンプルにハイブリダイズさせます。

警告

この試薬のセットには、生殖毒性の可能性が高い脂肪族アミドである、ホルムアミドが含まれています。吸入、経口摂取、皮膚や目への接触により、怪我をする可能性があります。廃液や未使用の内容物は、地域の行政安全基準に従って廃棄してください。

詳細については、http://www.illumina.com/msds でこのキットの MSDS を参照してください。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:1 時間 35 分間
- ハンズオン時間:15 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
CAT (Custom Amplicon Oligo Tube)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
OHS2 (Oligo Hybridization for Sequencing 2)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
ACD1	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
ACP1	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
ゲノム DNA 3ページの「DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)」を参照してください。	必要に応じて	−15° ～ −25℃	ユーザー
96 ウェルスカート PCR プレート	1 プレート		ユーザー
アルミホイル粘着シール	2 シール		ユーザー
トラフ	必要に応じて		ユーザー

Preparation (準備)

1 3ページの「DNA Input Recommendations (DNA インプットに関する推奨事項)」に従って、DNA サンプルを定性化/定量化します。

2 −15° ～ −25℃ の貯蔵庫から Custom Amplicon Oligo Tube (CAT)、Oligo Hybridization for Sequencing 2 (OHS2)、Amplicon Control DNA 1 (ACD1)、Amplicon Control Oligo Pool 1 (ACP1)、およびゲノム DNA を取り出し、室温で解凍します。

注意
目に見える沈殿物や結晶が Oligo Hybridization for Sequencing 2 (OHS2) 内に形成されることがあります。そのため、この溶液は、使用する前にしっかりボルテックスし、チューブを明かりの前にかざしてすべての沈殿物が完全になくなっていることを目視検査してください。

3 96 ウェルプレート用ヒートブロックを 95℃ に設定します。

4 伸長–ライゲーション反応のステップに対する準備として、インキュベーターを 37℃ に予熱します。

5 Experienced User Card の最終ページ にあるテーブル、または Illumina Experiment Manager (TruSeq Amplicon をサンプル調製キットとして選択) を使用して、サンプルプレートレイアウトを作成します。追加ガイダンスは、TruSeq カスタムアンプリコン カルキュレータを使用してください。アンプリコンサイズと、アンプリコンの数と、DNA/CAT、ACD1/ACP1 (TSCA_Control)、インデックスプライマー各サンプルのプレートの位置とを記録してください。Illumina は16 サンプル以上を 1 バッチとして処理することを推奨します。

注意
Illumina では、調製するサンプルの各バッチにおいて付属のコントロール (ACD1/ACP1) を使用することを義務付けています。これらの付属コントロールを使用することにより、サポートが必要な時に Illumina テクニカルサポートがトラブル解決のお手伝いをすることができます。このコントロール反応がアッセイに含まれていない場合、お手伝いすることができません。

注意
コントロール ACP1 はヒトに固有であり、他の種からの DNA には機能しません。

Procedure (手順)

1 **HYP** (HYbridization Plate) バーコードプレートシールを新しい 96 ウェル PCR プレートに貼ります。

2 アッセイのコントロールとして、**HYP** プレートの 1 つのウェルに DNA ACD1と 5 µl の TE または水を添加します。

3 アッセイで使用する HYP プレートの残りの各ウェルに、ゲノム DNA またはFFPE DNA 10 µl を添加します。より希釈されたサンプル (25 ng/µl 未満) の場合には、DNA は最大15 µl まで使用できます。

- 高品質のゲノム DNA のセットアップ

インプット:	量	DNA 濃縮
250 ng	10 µl	25 ng/µl
250 ng	最大 15 µl	≥ 16.7 ng/µl
50 ng	10 µl	5 ng/µl
50 ng	最大 15 µl	≥ 3.3 ng/µl

- FFPE ゲノム DNA のセットアップ例

インプット:	量	DNA 濃縮
250 ng	10 µl	25 ng/µl
250 ng	最大 15 µl	≥ 16.7 ng/µl

4 Amplicon Control DNA 1 (ACD1) を含むウェルに、Amplicon Control Oligo Pool 1 (ACP1) 5 µl を添加します。

5 マルチチャネルピペットを使用して、ゲノム DNA を含むウェルに Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) 5 µl を添加します。クロスコンタミネーションを避けるため、カラムごとにチップを交換してください。

注意
マルチチャネルピペットを使用する場合、ピペット操作を正確に行うように注意してください。つまり、各チューブ内にオリゴプール 70 µl を含む 8 連 PCR チューブストリップから Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) をピペッティングしてプレートの全 12 カラムをカバーすることを、Illumina では推奨します。

6 サンプルの量が不均等だったり、サンプルが各ウェルの底に集まっていない場合は、以下を行ないます。

a アルミホイル粘着シールで HYP プレートを密封し、ゴムローラーまたはシーリングウェッジを使用して密閉します。

注意
このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

b 20℃ でプレートを 1,000 xg で 1 分間遠心します。

7 マルチチャネルピペットを使用して、HYP プレートの各ウェルに Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 2 (OHS2) 35 µl を添加します。上下に 3 ～ 5 回、そっとピペッティングして混ぜ合わせます。クロスコンタミネーションを避けるため、カラムごとにチップを交換してください。

注意
Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 2 (OHS2) 内に沈殿物や結晶がないことを確認してください。

注意
Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) と Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 2 (OHS2) を混ぜ合わせて保管しないでください。混ぜ合わせてしまった場合、冷凍で保管しても Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) が不安定になります。

8 アルミホイル粘着シールで HYP プレートを密封し、ゴムローラーまたはシーリングウェッジを使用して密閉します。

9 20℃ でプレートを 1,000 xg で 1 分間遠心します。

10 95℃ に予熱したヒートブロック上に HYP プレートを置き、1 分間インキュベートします。

11 ヒートブロック上にプレートを置いたまま、温度を 40℃ に設定し、さらに 80 分間インキュベートします。

注意
インキュベートする際には、ヒートブロックの温度が徐々に 95℃ から 40℃ へと下がるようにする必要があります。このプロセスは通常80分かかります。この徐冷却は、適切にハイブリダイズするために非常に重要です。PCR サーマルサイクラーによる能動的冷却は行わないでください。

Removal of Unbound Oligos (非結合オリゴの除去)

このプロセスでは、サイズ選択の可能なフィルタープレートを使用して、ゲノム DNA にハイブリダイズしなかった余分な非結合オリゴを取り除きます。Stringent Water 1 (SW1) を使用する 2 回の洗浄ステップにより、非結合オリゴを確実に除去します。また、Universal Buffer 1 (UB1) を使用する 3 回目の洗浄ステップは、Stringent Water 1 (SW1) を取り除き、伸長–ライゲーション反応ステップのためにサンプルを調製します。

警告

この試薬のセットには、生殖毒性の可能性が高い脂肪族アミドである、ホルムアミドが含まれています。吸入、経口摂取、皮膚や目への接触により、怪我をする可能性があります。容器や未使用の内容物は、地域の行政安全基準に従って廃棄してください。

詳細については、http://www.illumina.com/msds でこのキットの MSDS を参照してください。

警告

この試薬セットには、β–メルカプトエタノールが含まれています。以下の手順は、フード内または換気の良い場所で行ってください。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:20 分
- ハンズオン時間:20 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
ELM3 (Extension–Ligation Mix 3) – 伸長–ライゲーション反応ステップに対する準備として解凍したもの	1 チューブ	–15° ～ –25℃	Illumina
SW1 (Stringent Water 1)	1 チューブ	2° ～ 8℃	Illumina
UB1 (Universal Buffer 1)	1 チューブ	2° ～ 8℃	Illumina
フィルタープレート (リッド付)	1 プレート		Illumina
アダプターカラー (再使用可能)	1 プレート		Illumina
MIDI プレート	1 プレート		ユーザー
トラフ	必要に応じて		ユーザー

Preparation (準備)

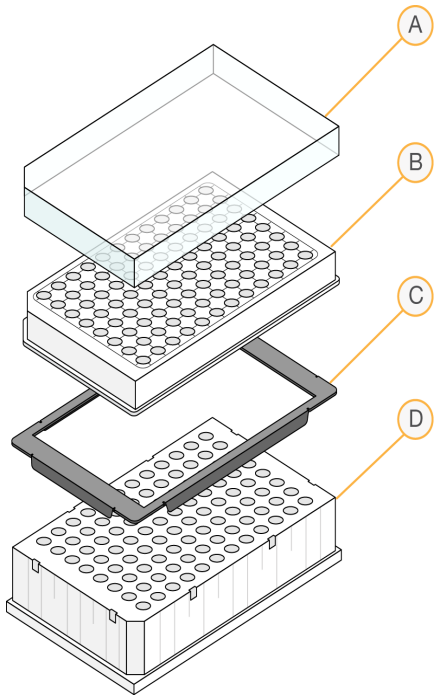
1 −15° ～ −25°C の貯蔵庫から Extension−Ligation Mix 4 (ELM4) チューブを取り出し、室温で解凍します。
Extension−Ligation Mix 4 (ELM4) は伸長−ライゲーション反応のステップで使用され、溶解するまでに約 20 分間かかります。

2 2° ～ 8°C の貯蔵庫から Stringent Water 1 (SW1) および Universal Buffer 1 (UB1) を取り出し、室温で放置します。

3 フィルタープレートユニット (FPU) アセンブリを上から下へと順番に組み立てます。

注意
このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

図 2 フィルタープレートユニットアセンブリ



A リッド

B フィルタープレート
C アダプターカラー
D MIDI プレート

4 FPU (Filter Plate Unit) バーコードプレートシールを、組み立てた FPU のフィルタープレート部分に貼ります。

5 以下のようにして、FPU のメンブレン (フィルタープレートのフィルター部分) を予洗します。
   a マルチチャネルピペットを使用して、各ウェルに Stringent Water 1 (SW1) 45 µl を添加します。
   b 専用のリッドで FPU プレートをカバーし、遠心ステップの実行中はカバーしたままの状態にします。
   c 20℃ で FPU を 2,400 xg で 10 分間遠心します。

注意
現在のアッセイで使用するウェルのみを予洗してください。以前に開けたフィルタープレートの未使用のウェルを次回のアッセイで利用することは可能ですが、前回のアッセイで使用済みのウェルは再利用しないでください。

6 予洗のステップを実行した後でかなりの量 (ウェルにつき >15 µl) のバッファーが残留している場合は、新しいフィルタープレートに取り替えます。

注意
Illumina は、ラボにおける一般補給品として予備のフィルタープレート (FC-130-1006) を常に用意しておくことを強くお勧めします。

Procedure (手順)

1 80 分間のインキュベートの後、ヒートブロックが 40℃ に冷えていることを確認します。ヒートブロック上に HYP プレートを置いたまま、ゴムローラーまたはシーリングウェッジを使用してシールをプレートへ圧着し、しっかりと密閉されるようにしてください。

2 ヒートブロックから HYP プレートを取り出し、20℃ でプレートを 1,000 xg で 1 分間遠心して凝縮物を集めます。

3 65 µl に設定したマルチチャネルピペットを使用して、HYP プレートの各ウェルからサンプル全量を取り出し、FPU プレートの対応する予洗済みウェルの中央に移します。クロスコンタミネーションを避けるため、カラムごとにチップを交換してください。

4 専用のリッドで FPU プレートをカバーし、20℃ で FPU を 2,400 xg で 2 分間遠心します。

5 以下のようにして FPU プレートを洗浄します。

a マルチチャネルピペットを使用して、各サンプルウェルに Stringent Water 1 (SW1) 45 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。

b 専用のリッドで FPU プレートをカバーし、FPU を 2,400 xg で 2 分間遠心します。

注意
2 分間遠心しても、Stringent Water 1 (SW1) が完全に排出されない場合は、プレートをさらに遠心できますが、10 分間以内に抑えてください。Stringent Water 1 (SW1) の排出があまりにも不完全な場合、特異性の低いターゲット濃縮となります。

6 以下のようにして、洗浄を繰り返します。

a マルチチャネルピペットを使用して、各サンプルウェルに Stringent Water 1 (SW1) 45 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。

b 専用のリッドで FPU プレートをカバーし、2,400 xg で 2 分間遠心します。

注意
2 分間遠心しても、Stringent Water 1 (SW1) が完全に排出されない場合は、プレートをさらに遠心できますが、10 分間以内に抑えてください。Stringent Water 1 (SW1) の排出があまりにも不完全な場合、特異性の低いターゲット濃縮となります。

7 この時点までに MIDI プレートに集まったすべての溶液 (ホルムアミドと非結合オリゴを含む廃液) を、適切な危険廃液容器に廃棄します。その後で、FPU (使用済み) を組み立て直します。この MIDI プレートは、残りのプロセス (増幅前まで) で廃液回収用に再利用できます。

8 マルチチャネルピペットを使用して、各サンプルウェルに Universal Buffer 1 (UB1) 45 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。

9 専用のリッドで FPU プレートをカバーし、FPU を 2,400 xg で 2 分間遠心します。

注意
2 分間遠心しても、Universal Buffer 1 (UB1) が完全に排出されない場合は、プレートをさらに遠心できますが、10 分間以内に抑えてください。

Extension–Ligation of Bound Oligos (結合オリゴの伸長–ライゲーション反応)

このプロセスでは、上流および下流のハイブリダイズ済みオリゴを、DNA の伸長–ライゲーション反応で連結させます。DNA ポリメラーゼが上流オリゴを起点に伸長反応を行い、対象領域の DNA を合成します。この反応は下流オリゴの 5' 末端まで続き、その後、DNA ライゲースの作用で伸長した DNA を下流オリゴと連結させます。伸長ライゲーションより、対象領域の両脇に、PCR 増幅に必要なシーケンスが結合した DNA 産物が形成されます。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:50 分
- ハンズオン時間:5 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
ELM4 (Extension–Ligation Mix 4)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
アルミホイル粘着シール	1 シール		ユーザー
トラフ	必要に応じて		ユーザー

Procedure (手順)

1 マルチチャネルピペットを使用して、FPU プレートの各サンプルウェルに ELM4 を45 µl 添加します。伸長–ライゲーション反応は、フィルタープレートのフィルター部分 (メンブレン) で起こります。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。

2 アルミホイル粘着シールで FPU プレートを密封します。インキュベート中にホイルシールが動かないようにするため、専用リッドをその上に乗せてカバーします。

3 FPU 全体 (リッド、フィルタープレート、アダプターカラー、および MIDI プレートが組み立てられた状態のもの) を、37℃ に予熱したインキュベーター上に置き、45 分間インキュベートします。

4 次のセクションで説明されているとおりに、FPU プレートのインキュベート中に IAP (Indexed Amplification Plate) を用意します。

PCR Amplification (PCR 増幅)

このステップでは、DNA の伸長–ライゲーション反応の産物を PCR 増幅します。増幅用のプライマーには、クラスター形成に必要な共通アダプターシーケンス (P5 および P7) と、サンプルマルチプレックスのためのインデックスシーケンス (i5 および i7) の両方が含まれ、PCR 反応後にこれらのシーケンスが伸長–ライゲーション反応の産物に追加されます。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:85 ～ 105 分 (使用する PCR サイクル数によって異なる)
- ハンズオン時間:30 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
PMM2 (PCR Master Mix 2)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
i5 プライマー (A5XX)	各プライマーにつき 1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
i7 プライマー (A7XX)	各プライマーにつき 1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
TDP1 (TruSeq DNA Polymerase 1)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
Microseal 'A' 粘着フィルム	1		ユーザー
50 mM NaOH (1 週間以内に 10N NaOH から調製したもの)	96 サンプルにつき 3.5 ml		ユーザー
96 ウェルスカート PCR プレート	1 プレート		ユーザー
トラフ	必要に応じて		ユーザー

Preparation (準備)

1 Experienced User Card で Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) 内におけるアンプリコンサイズおよびアンプリコン数を Lab Tracking Form に記録します。

この情報は、アッセイに対する PCR サイクル条件を決定するために使用され、DesignStudio またはマニフェストファイルで見つけることができます。

2 新鮮な 50 mM NaOH (1 週間以内に調製したもの) を用意します。

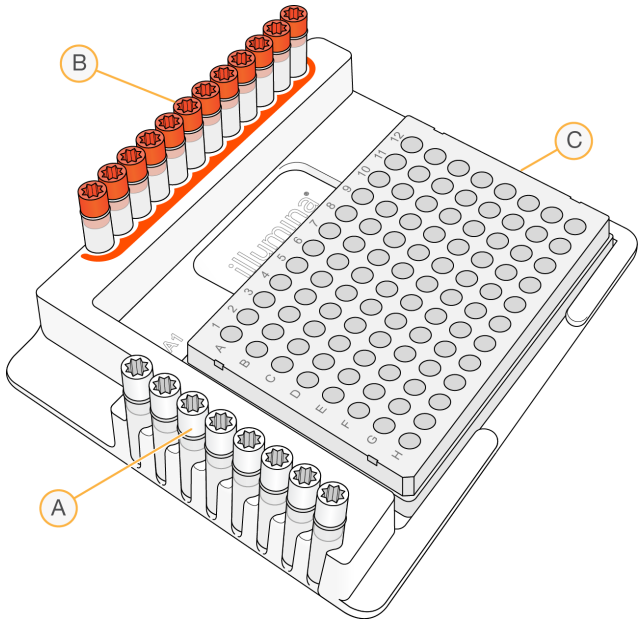
3 Illumina Experiment Manager と TruSeq カスタムアンプリコン カルキュレータを使用して、アッセイに使用するインデックスプライマーを決めます。インデックスプライマーの位置はExperienced User Card の最終ページ をご覧ください。

4 −15° ～ −25℃ の貯蔵庫から PCR Master Mix 2 (PMM2) とインデックスプライマー (i5 および i7) を取り出してベンチ上におき、室温で解凍します。
PCR Master Mix 2 (PMM2) とインデックスプライマーが溶解するまでには、約 20 分間かかります。

5 インデックスプライマーが完全に溶解したら、各チューブをボルテックスして混ぜ合わせ、微量遠心機で軽く遠心します。微量遠心機のアダプターには、1.7 mL エッペンドルチューブを使用してください。

注意
このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

6 以下のようにして、プライマーをラック (TruSeq インデックスプレートフィクサー) に配置します。
   a i5 プライマーチューブ (白いキャップ、透明な溶液) を、ラックの行 A ～ H の方向 (ラックの縦方向) に並ぶように配置します。
   b i7 プライマーチューブ (オレンジのキャップ、黄色い溶液) を、ラックのカラム 1 ～ 12 の方向 (ラックの横方向) に並ぶように配置します。



A　i5 プライマー (白いキャップ)
B　i7 プライマー (オレンジのキャップ)
C　IAP プレート

7　IAP (Indexed Amplification Plate) バーコードプレートシールを新しい 96 ウェル PCR プレートに貼ります。

8　マルチチャネルピペットを使用して、IAP プレートの各カラムに i5 プライマー (透明な溶液) 4 µl を添加します。カラムごとにチップを交換する必要はありません。

9　インデックスのクロスコンタミネーションを避けるため、元々付いていた*白*のキャップは破棄し、TruSeq カスタムアンプリコンインデックスキットに付属している新しい*白*のキャップをプライマーチューブに取り付けます。

10　マルチチャネルピペットを使用して、IAP プレートの各行に i7 プライマー (黄色い溶液) 4 µl を添加します。***インデックスのクロスコンタミネーションを避けるため、行ごとにチップを交換してください。***

11　インデックスのクロスコンタミネーションを避けるため、元々付いていた*オレンジ*のキャップは破棄し、TruSeq カスタムアンプリコンインデックスキットに付属している新しい*オレンジ*のキャップをプライマーチューブに取り付けます。すべてのインデックスプライマーチューブを作業エリアから取り除いてください。

12 96 サンプルに対しては、TruSeq DNA Polymerase 1 (TDP1) 56 µl を PCR Master Mix 2 (PMM2) 2.8 ml (1 チューブ全体) に添加します。PMM2/TDP1 マスターミックスを、チューブごと 20 回転倒混和してよく混ぜ合わせます。このミックスは、次のセクションで IAP プレートに添加します。

注意
使用前に必ずTDP1 を PMM2 に添加してください。PMM2/TDP1 マスターミックスを保管することは避けてください。

Procedure (手順)

1 45 分間の伸長–ライゲーション反応が完了したら、インキュベーターから FPU を取り出します。アルミホイル粘着シールを取り除き、フィルタープレートのリッドに取り替えます。
反応液の上清を廃液プレートへ効果的に排出させるため、遠心する前にアルミホイルシールを取り除くことが推奨されます。

2 FPU を 2,400 xg で 2 分間遠心します。

3 マルチチャネルピペットを使用して、FPU プレートの各サンプルウェルに 50 mM NaOH 25 µl を添加します。ピペットチップをフィルタープレートのメンブレン部分に近づけて、NaOH 溶液を上下に 5 ～ 6 回ピペッティングします。カラムごとに、チップを交換してください。

4 FPU プレートを室温で 5 分間インキュベートします。

5 FPU プレートのインキュベート中に、マルチチャネルピペットを使用して PMM2/TDP1 マスターミックス 22 µl を取り出し、インデックスプライマーを含む IAP プレートの各ウェルに移します。サンプルごとに、チップを交換してください。

6 以下のようにして、FPU プレートから溶出したサンプルを、IAP プレートに移します。

a P20 マルチチャネルピペットを 20 µl に設定します。

b 細いチップを使用して、FPU プレートのカラム 1 内で NaOH 溶液を上下に 5 ～ 6 回ピペッティングします。次に、FPU プレートから NaOH 溶液 20 µl を取り出し、IAP プレートの対応するカラムに移します。上下に 5 ～ 6 回、そっとピペッティングし、FPU プレートから移した DNA を PMM2/TDP1 マスターミックスとしっかり混ぜ合わせます。

注意
FPU プレートを少し傾けると、サンプルの取り出しが容易になり、ピペッティング時における気泡の発生を抑えることもできます。

c FPU プレートの残りのカラムについても、同じ要領でサンプル溶液を取り出して IAP プレートへと移します。インデックスおよびサンプルのクロスコンタミネーションを避けるため、カラムごとにチップを交換してください。

d すべてのサンプルを移し終えたら、FPU の一番下に置いておいた廃液回収用の MIDI プレートを破棄してもかまいません。金属製のアダプターカラーは、次回のアッセイに再利用できます。FPU ユニットのフィルタープレートの一部ウェルのみを使用した場合は、使用した部分が分かるように印を付けます。FPU プレートはフィルタープレートのメンブレンへのコンタミネーションを避けるために密封したビニール袋にリッドと共に入れ、保管してください。

7 Microseal 'A' 粘着フィルムで IAP プレートをカバーし、ゴムローラーで密閉します。

8 20℃ でプレートを 1,000 xg で 1 分間遠心します。

9 コンタミネーションを避けるため IAP プレートを増幅後専用エリアに移動させます。

10 以下のプログラムと、次の表の PCR サイクル数 (X) を使用して、サーマルサイクラーで PCR を実行します。必要な PCR サイクル数は、表に記載されているアンプリコンサイズ、CAT 内のアンプリコン数、DNA インプットのタイプ、DNA インプットの量に基づいて計算されます。

注意
ACD1/ACP1 コントロールは、Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) と同じ条件を使用して処理できます。

表 1 100–250 ng

アンプリコンサイズ	150/175 bp		250 bp	425 bp
DNA インプット	高品質	FFPE	高品質	高品質
	PCR サイクル数 (X)			
<96 アンプリコン	29	31	30	30
97–384 アンプリコン	25	27	25	26
385–768 アンプリコン	23	25	24	25
769–1,536 アンプリコン	22	24	23	24

表 2 50–99 ng

アンプリコンサイズ	150/175 bp	250 bp	425 bp
DNA インプット	高品質	高品質	高品質
	PCR サイクル数 (X)		
<96 アンプリコン	32	33	33

アンプリコンサイズ	150/175 bp	250 bp	425 bp
97–384 アンプリコン	28	28	29
385–768 アンプリコン	26	27	28
769–1,536 アンプリコン	25	26	27

- 95℃ で 3 分間
- 以下を X サイクル:
  - 95℃ で 30 秒間
  - 66℃ で 30 秒間
  - 72℃ で 60 秒間
- 72℃ で 5 分間
- 10℃ で保持

SAFE STOPPING POINT

すぐに*24ページの「PCR Clean-Up (PCR の精製)」*に進まない場合は、そのプレートはサーマルサイクラーに1晩置いておくことができます。もしくは2° ～ 8℃ で、最長 2 日間保管することができます。2 ～ 8℃ で保管する際には、Microseal 'A' 粘着フィルムを Microseal 'B' 粘着シールに取り替えてください。

PCR Clean-Up (PCR の精製)

このプロセスでは、他の反応成分からの PCR 産物を、AMPure XP Beads を使用して精製します。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:50 分
- ハンズオン時間:20 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
EBT (Elution Buffer + Tris)	1 チューブ	室温	Illumina
AMPure XP Beads	必要に応じて	2 ～ 8℃	ユーザー
新しく調製した 80% エタノール (EtOH)	96 サンプルにつき 40 ml	室温	ユーザー
96 ウェル MIDI プレート	2		ユーザー
Microseal 'B' 粘着フィルム	必要に応じて		ユーザー
トラフ	必要に応じて		ユーザー

Preparation (準備)

1 AMPure XP Beads を室温に戻します。

2 (アブソルートエタノールから) 80% エタノールを新しく調製します。

注意
洗浄のステップでは、必ず 80% エタノールを新しく調製してください。エタノールは空気中から水分を吸収する傾向があるため、80% エタノールを新しく調製することが最適な結果につながります。

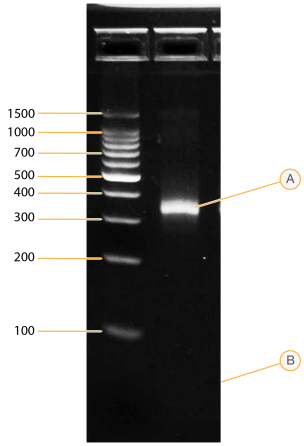
Procedure (手順)

1 20℃ で IAP プレートを 1,000 xg で 1 分間遠心し、凝縮物を集めます。

2 サンプルライブラリーが PCR で増幅されたかどうかを確認するため、コントロールおよび特定のテストサンプル溶液の一部を取り出し、4% アガロースゲルでの電気泳動 (5 µl) または Bioanalyzer (1 µl) 上で検査します。それぞれのアンプリコン長さに対して期待される PCR 産物のサイズは、次の表のとおりです。

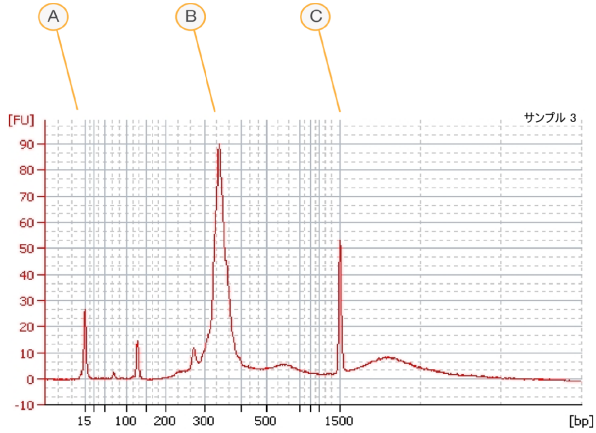
アンプリコンサイズ	期待される PCR 産物のサイズ
150 bp	最大 280 bp
175 bp	最大 310 bp
250 bp	最大 350 bp
425 bp	最大 570 bp

図 3 アガロースゲル電気泳動の場合の例 (期待される ACP1/ACD1 PCR 産物が示されている)



A 250 bp のアンプリコンに対して期待される PCR 産物 (最大 350 bp)
B プライマー

図 4 Bioanalyzer の場合の例 (期待される ACP1/ACD1 PCR 産物が示されている)



A マーカー
B 250 bp のアンプリコンに対して期待される PCR 産物 (最大 350 bp)
C マーカー

注意

TruSeq CAT オリゴプールを初めて使用する際には、ゲル電気泳動または Bioanalyzer を用いてライブラリーの品質を評価することが強く推奨されます。実験のサンプルごとにこの評価を実施する必要はありません。

Illumina は、この評価にはAmplicon Control DNA 1 (ACD1) および Amplicon Control Oligo Pool 1 (ACP1) で生成されたコントロールの反応も含めることをお願いしています。これにより、問題の解決が必要な場合に Illumina カスタマーサポートによるトラブルシューティングが可能になります。

3 **CLP** (CLean-up Plate) バーコードプレートシールを新しい MIDI プレートに貼ります。

4 マルチチャネルピペットを使用して、CLP プレートの各カラムに、アンプリコンサイズに対応して適量の AMPure XP Beads (次の表を参照) を添加します。

注意
ACD1/ACP1 コントロールは、Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) と同じ条件を使用して処理できます。

アンプリコンサイズ	AMPure XP Beads (µl)
150 bp	60 µl
175 bp	60 µl
250 bp	45 µl
425 bp	35 µl

5 60 µl に設定したマルチチャネルピペットを使用して、IAP プレートから PCR 産物をすべて取り出し、CLP プレートに移します。サンプルごとに、チップを交換してください。

注意
このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

6 Microseal 'B' 粘着シールで CLP プレートを密封します。

7 マイクロプレートシェーカーで CLP プレートを、1,800 rpm で 2 分間振とうします。

8 プレートを室温で 10 分間インキュベートします (振とうはしない)。

9 磁気スタンド上にプレートを 2 分間または、上清が透明になるまで放置します。

10 CLP プレートを磁気スタンド上に置いたまま、100 µl に設定したマルチチャネルピペットを使用して、上清を注意深く取り除いて廃棄します。サンプルごとに、チップを交換してください。

注意
チップにビーズが吸引されてしまった場合には、ビーズをプレートに戻し、磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置してください。

11 CLP プレートを磁気スタンド上に置いたまま、新しく調製した 80% エタノールを使用して、以下のようにしてビースを洗浄します。

a マルチチャネルピペットを使用して、新しく調製した 80% エタノール 200 µl を各サンプルウェルに添加します。クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、チップを交換する必要はありません。また、この時点では、ビーズを再懸濁する必要はありません。

b 磁気スタンド上にプレートを 30 秒間または上清が透明になるまでインキュベートします。

c 注意深く上清を取り除いて廃棄します。

12 CLP プレートを磁気スタンド上に置いたまま、エタノールを使用した 2 回目の洗浄を以下のようにして行ないます。

a マルチチャネルピペットを使用して、新しく調製した 80% エタノール 200 µl を各サンプルウェルに添加します。

b 磁気スタンド上にプレートを 30 秒間または上清が透明になるまでインキュベートします。

c 注意深く上清を取り除いて廃棄します。

d P20 マルチチャネルピペットを使用して、余分なエタノールを取り除きます。

13 CLP プレートを磁気スタンドから取り外し、ビーズを 10 分間風乾させます。

14 マルチチャネルピペットを使用して、CLP プレートの各ウェルに Elution Buffer + Tris (EBT) 30 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、チップを交換する必要はありません。

15 Microseal 'B' 粘着シールでプレートを密封します。

16 マイクロプレートシェーカーで CLP プレートを、1,800 rpm で 2 分間振とうします。

注意
すべてのサンプルが再懸濁されていることを確認してください。中のビーズが完全に再懸濁していないサンプルがある場合には、上下にそっとピペッティングしてビーズを再懸濁し、前の 2 つのステップを繰り返してください。

17 プレートを室温で 2 分間インキュベートします (振とうはしない)。

18 磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置します。

19 LNP (Library Normalization Plate) バーコードプレートシールを新しい MIDI プレートに貼ります。

20 P20 マルチチャネルピペットと細いペピットチップを使用して、CLP プレートから上清 20 µl を取り出し、LNP プレートに注意深く移します。クロスコンタミネーションを避けるため、サンプルごとにチップを交換してください。

注意
チップにビーズが吸引されてしまった場合には、ビーズをプレートに戻し、磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置してください。

21 Microseal 'B' 粘着シールで LNP プレートを密封し、1,000 xg で 1 分間遠心します。ウェルの底に上清がすべて集まっていることを確認してください。

Library Normalization (ライブラリーのノーマライズ)

このプロセスでは、プーリングされたサンプルでライブラリーの発現がより均等になるように、各ライブラリーの数量をノーマライズします。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:1 時間 20 分間
- ハンズオン時間:30 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
LNA1 (Library Normalization Additives 1)	1 チューブ	−15° ～ −25℃	Illumina
LNB1 (Library Normalization Beads 1)	1 チューブ	2° ～ 8℃	Illumina
LNW1 (Library Normalization Wash 1)	2 チューブ	2° ～ 8℃	Illumina
LNS2 (Library Normalization Storage buffer 2)	1 チューブ	室温	Illumina
0.1N NaOH (1 週間以内に調製したもの)	96 サンプルにつき 3 ml		ユーザー
96 ウェルスカート PCR プレート	1 プレート		ユーザー
15 ml コニカルチューブ	1 チューブ		ユーザー
Microseal 'B' 粘着フィルム	必要に応じて		ユーザー

警告

この試薬のセットには、生殖毒性の可能性が高い脂肪族アミドである、ホルムアミドが含まれています。吸入、経口摂取、皮膚や目への接触により、怪我をする可能性があります。容器や未使用の内容物は、地域の行政安全基準に従って廃棄してください。

詳細については、http://www.illumina.com/msds でこのキットの MSDS を参照してください。

警告
この試薬セットには、β-メルカプトエタノールが含まれています。以下の手順は、フード内または換気の良い場所で行ってください。

Preparation (準備)

注意
このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

1 新鮮な 0.1N NaOH (1 週間以内に調製したもの) を用意します。

2 -15° ～ -25℃ の貯蔵庫から Library Normalization Additives 1 (LNA1) を取り出し、室温に戻します。必要に応じて、20° ～ 25℃ の水槽を使用してください。

注意
目に見える沈殿物や結晶が Library Normalization Additives 1 (LNA1) 内に形成されることがあります。そのため、この溶液は、使用する前にしっかりボルテックスし、チューブを明かりの前にかざしてすべての沈殿物が完全になくなっていることを目視検査してください。

3 2° ～ 8℃ の貯蔵庫から Library Normalization Beads 1 (LNB1) および Library Normalization Wash 1 (LNW1) を取り出し、室温に戻します。
必要に応じて、20° ～ 25℃ の水槽を使用してください。

4 時々チューブを逆さまにして様子を見ながら、少なくとも 1 分間、またはビーズが十分に再懸濁し、チューブを逆さまにしてもチューブの底にペレットが見られなくなるまで、Library Normalization Beads 1 (LNB1) をしっかりとボルテックスします。

Procedure (手順)

1 96 サンプルに対しては、Library Normalization Additives 1 (LNA1) 4.4 ml を新しい 15 ml コニカルチューブに添加します。

2 1,000 µl に設定した P1000 ピペットを使用して、チューブの底にあるビーズペレットが完全に再懸濁するまで上下に 15 ～ 20 回ピペッティングし、Library Normalization Beads 1 (LNB1) をしっかり再懸濁します。

注意
チューブの底にある Library Normalization Beads 1 (LNB1) ビーズペレットを完全に再懸濁することは非常に重要です。P1000 ピペットを使用することにより、ビーズが均一に再懸濁され、チューブの底にビーズの塊が残りにくくなります。これは、フローセル上で一定のクラスター密度を再現性良く得るために必須です。

3 Library Normalization Beads 1 (LNB1) が再懸濁したら直ちに、P1000 ピペットを使用して 800 µl を取り出し、Library Normalization Additives 1 (LNA1) を含む 15 ml コニカルチューブに移します。このチューブを 15 ～ 20 回転倒混和してよく混ぜてください。LNA1/LNB1 ビーズミックスは、96 サンプルに十分な量となります。このビーズミックスをトラフに注ぎ、直ちに次のステップで使用します。

注意
チューブ全体を 96 サンプルに対して使用する予定がない場合でも、ステップ 2 (1,000 µl に設定した P1000 ピペットを使用してビーズを完全に再懸濁する) を実行する必要があります。ただし、ステップ 3 以降では、実際のサンプル数に必要な量の Library Normalization Additives 1 (LNA1) と Library Normalization Beads 1 (LNB1) をそれぞれ混ぜ合わせて使用してください。P200 ピペットはビーズの取扱いに適さないため、Normalization Beads 1 (LNB1) の再懸濁には使用しないでください。残った Library Normalization Additives 1 (LNA1) および Library Normalization Beads 1 (LNB1) をそれぞれの推奨温度で別々に保管してください。試薬の安定性が低下するため、すぐに使用しない場合は、Library Normalization Beads 1 (LNB1) ビーズを冷凍保管したり、Library Normalization Additives 1 (LNA1) と混ぜ合わせた状態で保管することは避けてください。

4 マルチチャネルピペットを使用して、ライブラリーを含む LNP プレートの各ウェルに、LNA1/LNB1 ビーズミックス 45 µl を添加します。クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。

5 Microseal 'B' 粘着シールで LNP プレートを密封します。

6 マイクロプレートシェーカーで LNP プレートを、1,800 rpm で 30 分間振とうします。

注意
この 30 分間のインキュベーションは、ライブラリーを適切に正規化するために重要です。インキュベート時間が 30 分より短くても長くても、ライブラリーの発現およびクラスターの密度に影響する場合があります。

7 磁気スタンド上にプレートを 2 分間または、上清が透明になるまで放置します。

8 LNP プレートを磁気スタンド上に置いたまま、80 µl に設定したマルチチャネルピペットを使用して上清を注意深く取り除き、適切な危険廃液容器に廃棄します。

注意
チップにビーズが吸引されてしまった場合には、ビーズをプレートに戻し、磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置してください。

9 LNP プレートを磁気スタンドから取り外し、以下のようにしてビーズを Library Normalization Wash 1 (LNW1) で洗浄します。

a マルチチャネルピペットを使用して、各サンプルウェルに Library Normalization Wash 1 (LNW1) 45 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。
b Microseal 'B' 粘着シールで LNP プレートを密封します。
c マイクロプレートシェーカーで LNP プレートを、1,800 rpm で 5 分間振とうします。
d 磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置します。
e 上清を注意深く取り除き、適切な危険廃液容器に廃棄します。

10 LNP プレートを磁気スタンドから取り外し、以下のようにして Library Normalization Wash 1 (LNW1) での洗浄を繰り返します。
a マルチチャネルピペットを使用して、各ウェルに Library Normalization Wash 1 (LNW1) 45 µl を添加します。
クロスコンタミネーションを避けることができるのであれば、カラムごとにチップを交換する必要はありません。
b Microseal 'B' 粘着シールで LNP プレートを密封します。
c マイクロプレートシェーカーで LNP プレートを、1,800 rpm で 5 分間振とうします。
d 磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置します。
e 上清み液を注意深く取り除き、適切な危険廃液容器に廃棄します。
f P20 マルチチャネルピペットを使用して、余分な Library Normalization Wash 1 (LNW1) を取り除きます。

注意
P20 マルチチャネルピペットを使用して残留 Library Normalization Wash 1 (LNW1) を取り除くことは、保存用バッファーへの試薬のキャリーオーバーを防いだり、量的な変動 (ライブラリーの正規化に影響する) を減らしたりするために重要です。

11 LNP プレートを磁気スタンドから取り外し、サンプルを溶出させるために 0.1N NaOH (1 週間以内に調製したもの) 30 µl を各ウェルに添加します。

12 Microseal 'B' 粘着シールで LNP プレートを密封します。

13 マイクロプレートシェーカーで LNP プレートを、1,800 rpm で 5 分間振とうします。

14 5 分間の振とう中に、SGP (StoraGe Plate) バーコードプレートシールを新しい 96 ウェル PCR プレートに貼ります。

15 SGP プレートで使用する各ウェルに、Library Normalization Storage Buffer 2 (LNS2) 30 µl を添加します。

16 5 分間の撹拌の後、LNP プレートのすべてのウェルでビーズが完全に再懸濁していることを確認します。ビーズが完全に再懸濁していない場合は、上下にそっとピペッティングするか、また

はビーズを含むプレートをベンチ上で軽くたたき、ビーズを再懸濁してください。完全に再懸濁したことを確認したら、もう一度マイクロプレートシェーカーでプレートを 1,800 rpm で 5 分間振とうします。

17 磁気スタンド上に LNP プレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置します。

18 30 µl に設定したマルチチャネルピペットを使用して、LNP プレートから上清を取り出し、SGP プレートに移します。クロスコンタミネーションを避けるため、サンプルごとにチップを交換してください。

注意
チップにビーズが吸引されてしまった場合には、ビーズをプレートに戻し、磁気スタンド上にプレートを 2 分間または上清が透明になるまで放置してください。

19 Microseal 'B' 粘着シールで SGP プレートを密封し、1,000 xg で 1 分間遠心します。

注意
最終ライブラリーのプールは一本鎖 DNA で構成されており、アガロースゲルまたは Bioanalyzer のチップではよく分解しません。必要であれば、qPCR を品質管理に使用することができます。詳細については、『*Sequencing Library qPCR Quantification Guide (シーケンスライブラリー qPCR 定量化ガイド)*』を参照してください。

SAFE STOPPING POINT
ライブラリー正規化の完了後、すぐに*Library Pooling and MiSeq Sample Loading (ライブラリーのプーリングおよび MiSeq でのサンプルのロード)*、およびその後のMiSeq上でのシーケンスを行わない場合は、密封した SGP プレートを −15℃～ −25℃ で保管してください。

Library Pooling and MiSeq Sample Loading (ライブラリーのプーリングおよび MiSeq でのサンプルのロード)

MiSeq でのクラスター形成とシーケンスにあたり、ノーマライズしたライブラリーを Hybridization Buffer (HT1) で希釈した後、シーケンスの前に熱変性させます。

Estimated Time (推定時間)

- 総所要時間:10 分
- ハンズオン時間:10 分

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	保管温度	提供者
HT1 (Hybridization Buffer)	1 チューブ	−15° ～ −25°C	Illumina
エッペンドルフチューブ (スクリューキャップ式を推奨)	2 チューブ		ユーザー
8 連 PCR チューブストリップ	1		ユーザー
容量 2.5 L のアイスバケット	1		ユーザー

Preparation (準備)

1 1.5 ml 遠心チューブに適したヒートブロックを 96°C に設定します。

2 −15° ～ −25°C の貯蔵庫から MiSeq 試薬カートリッジを取り出し、室温で解凍します。

3 アイスバケットに氷と水を 3 対 1 の割合で混ぜて、アイスウォーターバスを用意します。

Procedure (手順)

1 SGP プレートを冷凍保管していた場合は、室温で解凍します。

2 20°C で SGP プレートを 1,000 xg で 1 分間遠心し、凝縮物を集めます。

3 PAL (Pooled Amplicon Library) バーコードプレートシールを新しいエッペンドルフチューブに貼ります。

4 シーケンスのためにプーリングするサンプルを判断します。ターゲット領域と希望のカバレッジの数に基づいて、サポートされているサンプルマルチプレックスレベルを計算してください。以下の表または TruSeq カスタムアンプリコン カルキュレーター (Illumina ウェブサイトの TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 サポートページにあります) を使用してください。

CAT オリゴプールから形成されるアンプリコン数	希望の平均カバレッジ*	MiSeq 1 ランあたりで推奨される最大プーリングサンプル数*	
		MiSeq v2	MiSeq v3
16	150x 500x	96 96	96 96
48	150x 500x	96 96	96 96
96	150x 500x	96 96	96 96
384	150x 500x	96 48	96 80
768	150x 500x	72 24	96 40
1536	150x 500x	36 12	60 20

* 実際の性能は、ターゲットとする遺伝子によって異なる場合があります。新しく設計した Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) 内における特定の遺伝子で予想外に低いカバレッジが見つかった場合、より深く解析するディープシーケンスが必要になることがあります。

5 SGP プレートを冷凍保管していた場合は、P200 マルチチャネルピペットを使用して、シーケンスする各ライブラリーを上下に 3 ～ 5 回ピペッティングして混ぜ合わせます。サンプルごとに、チップを交換してください。

6 P20 マルチチャネルピペットを使用して、シーケンスする各ライブラリー 5 µl を SGP プレートから取り出して 8 連 PCR チューブストリップへと、カラムごとに移します。クロスコンタミネーションを避けるため、カラムごとにチップを交換してください。Microseal 'B' 粘着シールで SGP プレートを密封し、保管します。

注意

このプロセスのビデオ実演の詳細については、4ページの「Additional Resources (追加のリソース)」

注意
使用後は、密封した SGP プレートを -15° ～ -25℃ で保管してください。

7 8 連 PCR チューブストリップの中身を混ぜ合わせ、PAL チューブに移します。**Pooled Amplicon Library (PAL)** は、よく混ぜ合わせてください。

8 **DAL** (Diluted Amplicon Library) バーコードプレートシールを新しいエッペンドルフチューブに貼ります。

9 大量の HT1 と、お使いのMiSeq 試薬キットバージョンに基づいて 表 3 で示されている **PAL** とを混合して **DAL** を作成します。PAL の移し替え時には、同じチップを使用して上下に 3 ～ 5 回ピペッティングし、チップをすすいですべての移し替えを確実に行います。

注意
PAL を希釈する HT1 の体積は、推奨されている装置 (振とう速度を校正したプレートシェーカーなど) に対してのものです。ノーマライゼーション手順の間は、標準的な実験条件 (20° ～ 25℃ など) を順守しています。クラスター密度が高すぎたり低すぎたりする場合には、ラボの器具、温度およびユーザーによる取扱いを確認した後で、それらに合わせてこの希釈の割合を変更してください。

表 3 プーリングの希釈

	HT1 の希釈	PAL の希釈
MiSeq v2	594 µl	6 µl
MiSeq v3	580 µl	20 µl

10 最高速度でチューブをボルテックスし、**Diluted Amplicon Library (DAL)** を混ぜ合わせます。

注意
残った **Pooled Amplicon Library (PAL)** を将来の使用に向けて保存する場合は、PAL チューブを -15° ～ -25℃ で保管してください。
希釈ライブラリーである **Diluted Amplicon Library (DAL)** は、MiSeq にロードする直前に新しく調製する必要があります。**Diluted Amplicon Library (DAL)** の状態で保管したサンプルは、安定性が低く、クラスター密度の著しい低下を引き起こす恐れがあるため、使用しないでください。

11 ヒートブロックを使用して、DAL チューブを 96℃ で 2 分間インキュベートします。

12 インキュベートの後、DAL チューブを 1 ～ 2 回転倒混和して混ぜ合わせたら直ちに、アイスウォーターバスに入れます。

13 DAL チューブをアイスウォーターバス内に 5 分間入れておきます。

注意
MiSeq フローセルでテンプレートが効率的にロードされるようにするため、この熱変性のステップは、**Diluted Amplicon Library (DAL)** を MiSeq 試薬カートリッジにロードする直前に実行する必要があります。

14 **Diluted Amplicon Library (DAL)** を、解凍した MiSeq 試薬カートリッジの「**Load Samples**」リザーバーにロードします。

15 『*MiSeq System User Guide (MiSeq システムユーザーガイド)*』に示されているとおりに、ライブラリーをシーケンスします。

注意
Illumina は CAT の増幅サイズより小さいリード長を選択することを推奨しています。

Supporting Information (サポート情報)

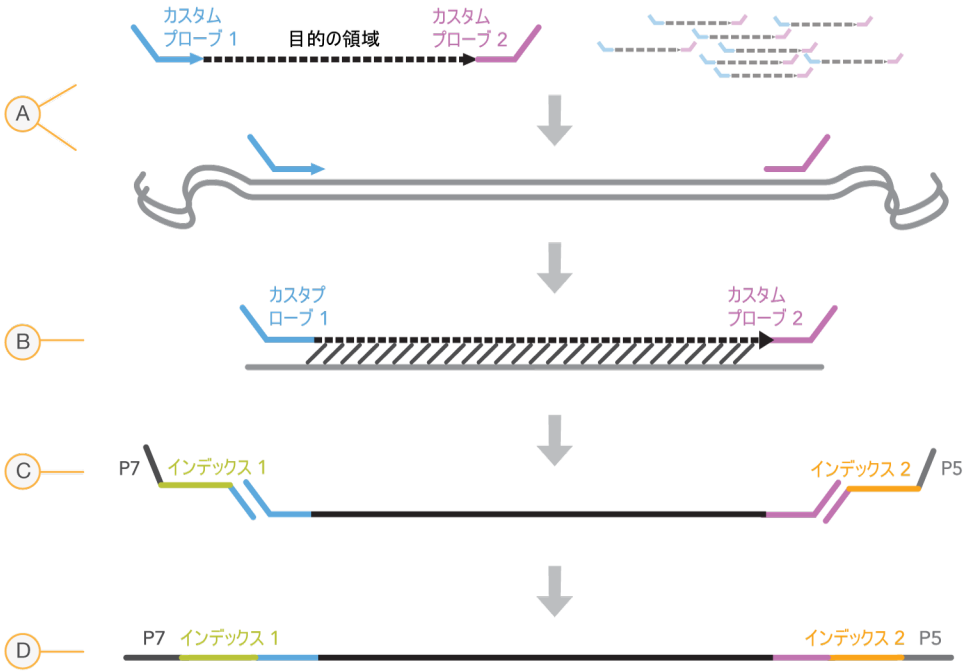
Introduction (はじめに) 40
How Does the TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Assay Work? (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製アッセイの機能について) 41
TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Process Overview (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製プロセスの概要) 43
Acronyms (頭字語) 46
TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Kit Contents (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製キットの内容) 48
User-Supplied Consumables (ユーザーが用意する消耗品) 51
Equipment (器具) 52
MiSeq Sample Sheet Preparation (MiSeq サンプルシートの準備) 54
Illumina Amplicon Viewer 56

Introduction (はじめに)

本ガイドに記載されているプロトコルは読者が付録を精査し、キット内容を確認し、必要な消耗品および装置すべてを準備していることを想定しています。

How Does the TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Assay Work? (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製アッセイの機能について)

各増幅用に 1 オリゴペアが設計されています。これらのオリゴのゲノム DNA へのハイブリダイゼーションが 96 ウェルプレートで起こり、続いて伸長–ライゲーション反応が行われると、対象領域の両脇に、ユニバーサルプライマーシーケンスが結合した DNA テンプレートが形成されます。その後、キットに付属のインデックスプライマーを使用して、DNA テンプレートの PCR 増幅、シングルチューブへのプーリング、シーケンシングが MiSeq システムで実行されます。



A　カスタムオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイズ
B　伸長–ライゲーション反応
C　PCR によるインデックスとシーケンスアダプターの追加
D　MiSeq でシーケンスするための準備として最終増幅

パーツ番号15027983 改訂C JPN

TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Process Overview (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製プロセスの概要)

以下のステップは、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のプロセスを要約したものです。

Design Your Project (プロジェクトを設計する)

対象領域をターゲットとするためにオリゴを設計するには、Illumina の DesignStudio を使用してください。シンプルなインターフェースでカスタムプローブを簡単に設計できる無償の DesignStudio により、最適なアンプリコンを選択するための動的なフィードバックおよびプロジェクト総価格の見積りが可能です。DesignStudio を使用するには、MyIllumina アカウントが必要となります。ログイン後、**[Custom Products]** タブのリンクに従って、DesignStudio for TruSeq Custom Amplicon にアクセスしてください。

Place Your Order (オーダーする)

DesignStudio を使用して設計が完了したら、MyIllumina アカウントを使用して直接オーダーしてください。便利なツール **TruSeq Custom Amplicon Calculator** にアクセスすると、サポートしているサンプルマルチプレックスレベルをターゲット領域の数と希望のカバレッジに基づいて計算することができます。これについては、Illumina の Web サイトにある TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のサポートページにアクセスしてください。ダウンロードするには、MyIllumina アカウントが必要となります。オーダーする際には、MiSeq 試薬と、TSCA サンプル調製の実行に必要な他のコンポーネントも、併せてオーダーしてください。その他のコンポーネント (インデックスプライマーなど) に関する情報については、このガイドの48ページの「TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Kit Contents (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製キットの内容)」を参照してください。

Download Your Manifest File (マニフェストファイルをダウンロードする)

MiSeq で TruSeq カスタムアンプリコン シーケンスを行うには、マニフェストファイルが必要となります。マニフェストファイルにより、プロジェクトでターゲットとする領域のリスト (アライメントと解析のために MiSeq で使用) が提供されます。マニフェストファイルは、オーダーの出荷後にダウンロードできるようになります。現在のプロジェクトに対してだけでなく、過去のプロジェクトに対するマニフェストファイルもダウンロードすることができます。マニフェストファイルをダウンロードするには、MyIllumina アカウントが必要となります。ログイン後、**[Custom Products]** タブのリンクに従って、Product Files for TruSeq Custom Amplicon にアクセスしてください。

Prepare Libraries and Sample Sheet (ライブラリーの調製とサンプルシートの準備を行う)

ユーザーガイドで詳細に説明されているプロトコールを使用して、ライブラリーを調製してください。それと並行して、MiSeq が各サンプルとそれに対応するインデックスを識別するに使用するサンプルシートも準備してください。サンプルシートを準備するには、Illumina Experiment Manager を使用してください。このウィザードベースのアプリケーションにより、サンプルプレートのパラメーター (サンプル ID、ワークフロー、インデックスなど) と、96 ウェルプレートに該当するその他のパラメーターを記録する機能が提供されます。Illumina Experiment Manager は、あらゆる Windows プラットフォームで実行することができます。Illumina Experiment Manager はウェブサイト Illumina からダウンロードできます。アドレスはwww.illumina.com です。TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のサポートページにアクセスし、[Downloads] をクリックしてください。ダウンロードするには、MyIllumina アカウントが必要となります。

Sequence Libraries on MiSeq (MiSeq でライブラリーをシーケンスする)

TruSeq カスタムアンプリコンライブラリーは、ペアエンドシーケンスランを使用して MiSeq シーケンスシステム上でシーケンスする必要があります。MiSeq 装置の使用やランのセットアップに関する詳細については、『*MiSeq System User Guide (MiSeq システムユーザーガイド)*』を参照してください。

Analyze Data with Illumina Supported Software (Illumina 対応ソフトウェアを使用してデータを解析する)

MiSeq Reporter を使用してデータを解析する: MiSeq Reporter では、MiSeq シーケンスシステムによって生成されたベースコールを処理します。MiSeq Reporter は装置上のソフトウェアで、装置のプロセスに組み込まれています。MiSeq Reporter により、アライメントや構造多型などの情報が生成されます。TruSeq カスタムアンプリコンライブラリーに対するアウトプットファイルは、.bam 形式 (アラインされたリード) と .vcf 形式 (変異コール) になります。このソフトウェアの詳細については、『*MiSeq System User Guide (MiSeq システムユーザーガイド)*』または MiSeq Reporter のオンラインヘルプ (http://www.illumina.com/help/miseq_reporter/default.htm) を参照してください。

Illumina Amplicon Viewer: Illumina Amplicon Viewer は、TruSeq カスタムアンプリコン (TSCA) データに関して装置外での視覚化と解析を行うために設計、開発されています。Amplicon Viewer を使用すると、複数の MiSeq アンプリコンランからのデータ (カバレッジ、Q 値、変異コールなど) をインタラクティブに同時表示できるようになります。DesignStudio は、複数のアンプリコンが存在する大きな連続領域をカバーしなければならない場合がありますが、Illumina Amplicon Viewer は、カバレッジと変異を組み合わせて再構成した連続領域を適切に表示します。また、特定のサンプル、ターゲット、または変異に基づいてカスタムレポートをエクスポートすることもできます。Amplicon Viewer をダウンロードするには、MyIllumina アカウントでログインしてください。このソフトウェアの詳細については、http://www.illumina.com/help/amplicon_viewer/default.htm を参照してください。

TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Process Overview (TruSeq™ カスタムアンプリコン ライブラリー調製プロセスの概要)

Acronyms (頭字語)

表 4　TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 頭字語

頭字語	定義
ACD1	Amplicon Control DNA 1
ACP1	Amplicon Control Oligo Pool 1
CAT	Custom Amplicon Oligo Tube
CLP	CLean-up Plate
DAL	Diluted Amplicon Library
EBT	Elution Buffer + Tris
ELM4	Extension Ligation Mix 4
FPU	フィルタープレートユニット (Filter Plate Unit)
HT1	Hybridization Buffer
HYP	HYbridization Plate
IAP	Indexed Amplification Plate
LNA1	Library Normalization Additives 1
LNB1	Library Normalization Beads 1
LNP	Library Normalization Plate
LNS2	Library Normalization Storage Buffer 2
LNW1	Library Normalization Wash 1
OHS2	Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 2
PAL	Pooled Amplicon Library

頭字語	定義
PMM2	PCR Master Mix 2
SGP	保存用プレート (StoraGe Plate)
SW1	Stringent Wash 1
TDP1	TruSeq DNA Polymerase 1
UB1	Universal Buffer 1

TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Kit Contents (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製キットの内容)

TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製キットには以下のコンポーネントが含まれており、特に指定されていない場合はドライアイスを使用して出荷されます。受け取り後すぐに、増幅前専用エリアまたは増幅後専用エリアにて、コンポーネントを指定の温度で保管してください。

TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Kit v1.5 (Catalog # FC-130-1001) (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 キット v1.5 (カタログ # FC-130-1001))

▶ ボックス 1、増幅前

頭字語	試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
ACD1	Amplicon Control DNA 1	−15° ～ −25℃	増幅前専用
ACP1	Amplicon Control Oligo Pool 1	−15° ～ −25℃	増幅前専用
OHS2	Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 2	−15° ～ −25℃	増幅前専用
ELM4	Extension Ligation Mix 4	−15° ～ −25℃	増幅前専用
PMM2	PCR Master Mix 2	−15° ～ −25℃	増幅前専用
TDP1	TruSeq DNA Polymerase 1	−15° ～ −25℃	増幅前専用
SW1	Stringent Wash 1	2° ～ 8℃	増幅前専用
UB1	Universal Buffer 1	2° ～ 8℃	増幅前専用
	バーコードプレートシール (HYP、FPU、IAP 用)	室温	増幅前専用

警告

この試薬のセットには、生殖毒性の可能性が高い脂肪族アミドである、ホルムアミドが含まれています。吸入、経口摂取、皮膚や目への接触により、怪我をする可能性があります。容器や未使用の内容物は、地域の行政安全基準に従って廃棄してください。

詳細については、http://www.illumina.com/msds でこのキットの MSDS を参照してください。

▶ ボックス 2、増幅前

このボックスは室温で出荷されます。受け取り後すぐに、**ボックス 2 から LNB1 を取り出し、増幅後専用エリアにて 2° ～ 8℃ で保管してください。フィルタープレートは、増幅前専用エリアにて室温で保管してください。**

頭字語	試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
	フィルタープレート (リッド付)	室温	増幅前専用
LNB1	Library Normalization Beads 1	2° ～ 8℃	増幅後専用

▶ ボックス 3、増幅後

頭字語	試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
HT1	Hybridization Buffer	−15° ～ −25℃	増幅後専用
LNA1	Library Normalization Additives 1	−15° ～ −25℃	増幅後専用
LNW1	Library Normalization Wash 1	2° ～ 8℃	増幅後専用
LNS2	Library Normalization Storage Buffer 2	室温	増幅後専用
EBT	Elution Buffer + Tris	室温	増幅後専用
	バーコードプレートシール (CLP、LNP、SGP、PAL、DAL 用)	室温	増幅後専用

▶ ボックス 4、TruSeq カスタムアンプリコンオリゴボックス、増幅前

頭字語	試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
CAT	Custom Amplicon Oligo Tube	−15° ～ −25℃	増幅前専用

TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Index Kit (Catalog # FC-130-1003) (TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製インデックスキット (カタログ番号 FC-130-1003))

▶ ボックス 1、増幅前

試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
i5 インデックスプライマー、A501 ～ A508 (8 チューブ)	−15° ～ −25℃	増幅前専用
i7 インデックスプライマー、A701 ～ A712 (12 チューブ)	−15° ～ −25℃	増幅前専用

▶ ボックス 2、増幅前

試薬名	貯蔵庫の温度	エリア
i5 インデックスチューブキャップ、白	室温	増幅前専用
i7 インデックスチューブキャップ、オレンジ	室温	増幅前専用

Additional Components (その他のコンポーネント)

消耗品	カタログ番号	貯蔵庫の温度	エリア
TruSeq インデックスプレートフィクサーキット (必須であり、再利用可能)	FC-130-1005	室温	増幅前専用
TruSeq カスタムアンプリコンフィルタープレート (強く推奨)	FC-130-1006	室温	増幅前専用
TruSeq インデックスプレートフィクサーおよびカラーキット (必須であり、再利用可能)	FC-130-1007	室温	増幅前専用
Illumina FFPE QC キット (FFPE DNA サンプルに対して強く推奨)	WG-321-1001	-15° ～ -25℃	増幅前専用

User-Supplied Consumables (ユーザーが用意する消耗品)

数量	消耗品	サプライヤー
必要に応じて	10 N NaOH (タブレットから調製または標準溶液を使用)	一般のラボサプライヤー
3	96 ウェルスカート PCR プレート、0.2 ml、ポリプロピレン	BIO-RAD、パーツ番号 MSP-9601
3	96 ウェル保存用プレート、0.8 ml (MIDI プレート)	Fisher Scientific、パーツ番号 AB-0859 Fisher Scientific、パーツ番号 AB-0765
必要に応じて	Agencourt AMPure XP 60 ml キット	Beckman Coulter、パーツ番号 A63881/A63880
3	アルミホイル粘着シール	Beckman Coulter、パーツ番号 538619
必要に応じて	コニカルチューブ、15 ml	一般のラボサプライヤー
2	エッペンドルフ遠心チューブ (スクリューキャップ式を推奨)	一般のラボサプライヤー
40 ml	エタノール 200 プルーフ (分子生物学用)	一般のラボサプライヤー
1	Microseal 'A' 粘着フィルム	BIO-RAD、パーツ番号 MSA-5001
必要に応じて	Microseal 'B' 粘着シール	BIO-RAD、パーツ番号 MSB-1001
2	8 連 PCR チューブストリップ	一般のラボサプライヤー
必要に応じて	溶液溜め、PVC、非滅菌 (トラフ)	Labcor、パーツ番号 730-001
必要に応じて	アガロースゲル (250/425 bp アンプリコンの場合は 2%、150/175/250 bp アンプリコンの場合は 4%)	一般のラボサプライヤー
必要に応じて	DNA 1000 Kit (Bioanalyzer 用)	Agilent、パーツ番号 5067-1504 (300 サンプル分)
必要に応じて	DNA 分子量マーカー	一般のラボサプライヤー
必要に応じて	アイスバケット	一般のラボサプライヤー

Equipment (器具)

Pre-PCR (PCR 前)

器具	サプライヤー
37℃ インキュベーター	VWR International 製の強制空気オーブンまたは同等のもの
ヒートブロック (96 ウェル用)	Scigene 製の Hybex Microsample Incubator (PCR プレート用) 注意:このアッセイにはこのモデルが推奨されます。その理由は、受動的冷却 (PCR サーマルサイクラーで行われる能動的冷却の反対) を行うと、特異性と均一性が最高のターゲット濃縮を実現できるためです。
テーブルトップ遠心機	一般のラボサプライヤー製の、プロトコール指定速度を達成できるプレート遠心機

注意
増幅前のステップに専用のピペット、ピペットチップ、ボルテックスミキサー、遠心機を用意してください。

Post-PCR (PCR 後)

器具	サプライヤー
Magnetic Stand-96	Invitrogen 製の DynaMag™-96 Side Skirted
PCR 後プレートシェーカー	Q Instruments 製の BioShake iQ 高速サーマルミキサー (パーツ番号 1808-0506) または BioShake XP 高速サーマルミキサー (パーツ番号 1808-0505)
テーブルトップ遠心機	一般のラボサプライヤー製の、プロトコール指定速度を達成できるプレート遠心機
ゲル電気泳動用の器具と装置	一般のラボサプライヤー
[Optional] Bioanalyzer System	Agilent Technologies
ヒートブロック (1.5 ml 遠心チューブ用)	一般のラボサプライヤー

注意
増幅後のステップに専用のピペット、ピペットチップ、ボルテックスミキサー、ヒートブロック、遠心機を用意してください。

Thermal Cycler (サーマルサイクラー)

次の表では、選定されたサーマルサイクラーモデルごとの推奨設定がリストされています。Illumina では、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製のプロトコールをラボで実施したことがない場合に、下の表にリストされていないサーマルサイクラーを確認することを推奨しています。

サーマルサイクラー	温度モード	リッド温度	容器タイプ
BIO-RAD DNA Engine Tetrad 2	計算	加熱、100℃で保持	ポリプロピレンのプレートとチューブ
MJ Research DNA Engine Tetrad	計算	加熱	プレート
Eppendorf Mastercycler Pro S	グラジエント S、シミュレートチューブ	加熱	プレート

MiSeq Sample Sheet Preparation (MiSeq サンプルシートの準備)

MiSeq シーケンス用のサンプルシートは、『*MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide (MiSeq サンプルシートクイックリファレンスガイド)*』に従って作成してください。Illumina では、サンプルプレートとサンプルシートを準備するために Illumina Experiment Manager を使用することを推奨します。装置として [MiSeq] を選択した後、ワークフローとして [Targeted Resequencing] および [TruSeq Amplicon] を選択してください。Custom Amplicon Oligo Tube (CAT) の設計に使用する種に適したゲノムフォルダを選択するようにしてください。また、Experienced User Card と、Lab Tracking Form と、アッセイで使用する PCR プライマーに対応する適切なインデックスシーケンス (以下を参照) を使用することもできます。

注意
ACD1/ACP1 で調製したアッセイコントロールには、サンプル ID およびサンプル名 (TSCA_Control) をサンプルプレートとサンプルシートのファイル内で指定する必要があります。

注意
DNA インプットとして FFPE サンプルを使用した場合は、[TruSeq Amplicon Workflow-Specific Settings] で [Use Somatic Variant Caller] ボックスにチェックが入っていることを確認してください。

注意
Illumina は CAT の増幅サイズより小さいリード長を選択することを推奨しています。

i7 インデックス PCR プライマー	インデックスシーケンス
A701	ATCACGAC
A702	ACAGTGGT
A703	CAGATCCA
A704	ACAAACGG
A705	ACCCAGCA
A706	AACCCCTC
A707	CCCAACCT
A708	CACCACAC
A709	GAAACCCA

i7 インデックス PCR プライマー	インデックスシーケンス
A710	TGTGACCA
A711	AGGGTCAA
A712	AGGAGTGG

i5 インデックス PCR プライマー	インデックスシーケンス
A501	TGAACCTT
A502	TGCTAAGT
A503	TGTTCTCT
A504	TAAGACAC
A505	CTAATCGA
A506	CTAGAACA
A507	TAAGTTCC
A508	TAGACCTA

Illumina Amplicon Viewer

MiSeq シーケンスが完了すると、データが MiSeq Reporter によって自動的に解析されます。このデータは、Illumina Amplicon Viewer を使用して視覚化することが可能です。Amplicon Viewer は、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 (TSCA) データに関して装置外での視覚化と解析を行うために設計、開発されています。Amplicon Viewer を使用すると、複数の MiSeq アンプリコンランからのデータ (カバレッジ、Q 値、変異コール値など) をインタラクティブに同時表示できるようになります。また、特定のサンプル、ターゲット、または変異に基づいてカスタムレポートをエクスポートすることもできます。

Amplicon Viewer は、インプットとして MiSeq Reporter データを必要とします。Amplicon Viewer をダウンロードするには、MyIllumina アカウントでログインしてください。このソフトウェアの詳細については、http://www.illumina.com/help/amplicon_viewer/default.htm を参照してください。

Illumina Amplicon Viewer の使用方法に関するビデオ実演を見るには、TruSeq™ カスタムアンプリコンライブラリー調製 キットのサポートページにアクセスし、[Training] タブをクリックしてください。

テクニカルサポート

テクニカルサポートに関しては、Illumina カスタマーサポートまでお問い合わせください。

表 5　Illumina 一般問合わせ先情報

Illumina Web サイト	www.illumina.com
電子メール	techsupport@illumina.com

表 6　Illumina カスタマーサポート電話番号

地域	問合わせ先番号	地域	問合わせ先番号
北米	1.800.809.4566	イタリア	800.874909
オーストリア	0800.296575	オランダ	0800.0223859
ベルギー	0800.81102	ノルウェー	800.16836
デンマーク	80882346	スペイン	900.812168
フィンランド	0800.918363	スウェーデン	020790181
フランス	0800.911850	スイス	0800.563118
ドイツ	0800.180.8994	イギリス	0800.917.0041
アイルランド	1.800.812949	その他の国	+44.1799.534000

MSDSs (化学物質安全データシート)

化学物質安全データシート (MSDSs) は Illumina の Web サイト www.illumina.com/msds でご覧になれます。

Product Documentation (製品マニュアル)

製品のドキュメントは、Illumina の Web サイトから PDF ファイルでご利用いただけます。Illuminawww.illumina.com/support にアクセスして製品を選択し、[Documentation & Literature] をクリックしてください。

Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (北米外)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com